

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

ГЕНЕРАЛОВ И.И.*, САПЕГО Т.В.**, КУНДЕР Е.В.*

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

кафедра клинической микробиологии,*

*Витебская областная клиническая больница***

Резюме. В работе изучена каталитическая ДНКазная и амидазная активность сывороток больных аутоиммунными заболеваниями (системной красной волчанкой, аутоиммунным тиреоидитом), а также практически здоровых лиц (доноров крови) до и после адсорбции иммуноглобулинов класса G на стафилококковом реагенте (штамм Cowan I), содержащем протеин A в клеточной стенке. Выявлено, что у части больных аутоиммунными заболеваниями происходит уменьшение сывороточной ферментативной активности, что может быть связано с удалением из сыворотки каталитических антител (абзимов), а также иммунных комплексов. Дана сравнительная характеристика ферментативной активности сывороток и иммуноглобулинов.

Ключевые слова: поликлональные IgG человека, абзимы, ДНКазная активность, амидазная активность.

Abstract. Serum catalytic DNase and amidase activity in patients with various autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, autoimmune thyroiditis) and healthy donors was studied. Enzyme activity was evaluated before and after specific adsorption of serum IgG with staphylococcal reagent (Cowan I strain), containing protein A in the microbial cell wall.

Serum catalytic activity was found to be declined after adsorption in patients with autoimmune diseases, this probably being connected with the removal of catalytic antibodies (abzymes) and immune complexes from patients' sera. A comparative analysis of serum catalytic and abzyme activity is made in the article.

К настоящему времени доказано, что каталитические антитела (АТ), или абзимы, закономерно возникают в ходе поликлонального иммунного ответа [3, 8, 9]. Спектр таких АТ чрезвычайно разнообразен, причем с наибольшей частотой они выявляются при аутоиммунных заболеваниях (системной красной волчанке (СКВ), ревматоидном артрите (РА), аутоиммунном тиреоидите (АИТ), хронических демиелинизирующих заболеваниях центральной нервной системы), а также при беременности. Однако до сих пор исследования роли абзимной активности в патологии являются весьма немногочисленными. В большинстве до сих пор опубликованных работ приводятся лишь дока-

зательства ферментативной активности АТ без определения их связи с проявлениями болезней, лечением и возможным прогнозом [1, 2, 4]. Не выяснена роль таких АТ в патогенезе заболеваний, не определено клиническое значение оценки абзимной активности.

Нерешенной до сих пор проблемой является определение абзимов без непосредственного выделения препаратов иммуноглобулинов (ИГ) из сыворотки крови. С другой стороны, методы определения каталитической активности иммуноглобулинов пока недостаточно адаптированы для определения ферментативной активности цельных сывороток.

Изучение взаимосвязей между сывороточной ферментативной и абзимной активностью создает предпосылки к разработке новых методов лабораторной диагностики аутоиммунных

заболеваний, а также позволяет уточнить возможное участие абзимов в их патогенезе. В настоящей работе проведена дифференциальная оценка ферментативной активности сывороток крови больных аутоиммунными заболеваниями до и после адсорбции из них иммуноглобулинов класса G.

Методы

В работе были использованы бензоил-DL-аргинин-*p*-нитроанилид (БАПНА) производства фирмы Sigma, агароза, конъюгированная с белком А золотистого стафилококка (институт им.Пастера, г.С.-Петербург, Россия), ДНК тимуса теленка (Sigma), остальные реактивы – отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

В качестве материала для исследования использовались препараты иммуноглобулинов класса G, выделенные из сывороток крови больных аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), – 24 человека, системной красной волчанкой (СКВ) – 9 человек, а также доноров крови (11 человек) комбинированным аффинно-хроматографическим методом [5].

Контроль чистоты полученных ИГ проводили, как указано в [5, 6], включая иммуноэлектрофорез, электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в диссоциирующих условиях с окрашиванием геля Кумасси R250 (Fluka) или нитратом серебра.

Концентрацию IgG в сыворотках определяли по методу Манчини, концентрацию белка в очищенных препаратах IgG оценивали спектрофотометрией при 280 нм, а также микромоdifикацией метода Бредфорд.

С целью сопоставления исходной абзимной активности сывороток и иммуноглобулинов проводили адсорбцию иммуноглобулинов на аффинном сорбенте, содержащем стафилококковый протеин А. Протеин А является высокоаффинным реагентом, специфически связывающим IgG человека (подклассы G1, G2, G4.) Для сорбции был использован стафилококковый реагент, представляющий собой инактивированную микробную культуру *S. aureus*, содержащую белок А в клеточной стенке.

Стафилококковый реагент получали по методу, разработанному в С.-Петербургском

институте им. Л.Пастера, с нашими модификациями.

Для этого суточную агаровую культуру штамма Cowan 1 золотистого стафилококка засеивали на плотную питательную среду и выращивали в течение 12-14 ч. Сокращенное время культивирования обеспечивает окончание процесса в момент максимального накопления белка А в клетке.

Бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин и дважды отмывали от питательной среды в 0,05М фосфатном буферном растворе (ФБР) с pH 7,2-7,4. Сырую массу бактерий доводили до 10% концентрации с помощью соответствующего буфера (ФБР). Взвесь отмывых микробов фиксировали 1% раствором формальдегида, в течение 3 ч при постоянном перемещении в шюттель-аппарате. По окончании процесса бактериальные клетки четырежды отмывали ФБР от формальдегида, суспензию разводили до 10% концентрации и прогревали в течение 1 ч при 80°C для инактивации собственной протеолитической активности реагента. Затем клетки еще раз отмывали, ресуспендировали в ФБР и хранили до использования в виде 10% взвеси в течение недели. Перед адсорбцией необходимое количество осадка микробных клеток (обычно 0,3 мл на пробу) отмывали физиологическим раствором и обсушивали на фильтре после центрифугирования и осаждения.

Предварительные эксперименты показали отсутствие собственной ДНКазной и БАПНА-амидазной активности в полученном стафилококковом реагенте в условиях, соответствующих определению абзимной активности.

Сорбционная емкость реагента по IgG человека составила не менее 1,5-2,0 мг IgG человека на 0,3 мл реагента.

Для адсорбции сывороток больных препараты разводили в 10 раз физиологическим раствором на 0,025М Трис-HCl буфере. Разведенную сыворотку добавляли к осадку микробных клеток с протеином А. Инкубировали в течение 1 часа при 37°C. По окончании инкубации образцы центрифугировали при 6000 об/мин 15 минут, забирали надосадочную жидкость и проводили определение ДНКазной и БАПНА-амидазной активности по разработанным нами ранее методикам [6]. Одновременно определяли

ДНКазную и БАПНА-амидазную активность неадсорбированных сывороток, разведенных 1/10 (контроль сывороток).

Результаты определения ДНКазной активности сывороток выражали в единицах активности соответствующего фермента (ЕД). Реакцию калибровали по коммерческому препарату ДНКазы (панкреатическая ДНКазы права Олайнского завода, Латвия, активность 4250 ЕД на 1 мг белка). Результаты определения БАПНА-амидазной активности выражали в единицах оптической плотности (ЕОП).

Для оценки возможности неспецифической сорбции сывороточных ферментов на микробных клетках проводили контрольную адсорбцию сывороток больных на стафилококковом реагенте из штамма *S. epidermidis*. Данный вид стафилококка не содержит протеин А в клеточной стенке. В этих экспериментах было показано, что неспецифическая сорбция сывороточной ферментативной активности на клетках стафилококкового реагента является невысокой и не превышает 0,25 ЕД для ДНКазной активности или 0,01 ЕОП для БАПНА-амидазной активности.

Полученные значения неспецифической сорбции учитывали при окончательной оценке каталитической активности исследуемых сывороток.

Результаты и обсуждение

Препараты иммуноглобулинов, выделенные из сывороток больных и доноров, оказались гомогенными по результатам диссоциирующего электрофореза (рис. 1). Препараты содержали только IgG без примесей других классов иммуноглобулинов. Микробиологический контроль полученных препаратов ИГ бактериальной контаминации не выявил.

Проведенная оценка сывороточной ферментативной активности обнаружила ряд различий между обследованными группами. Результаты определения исходного уровня ферментативной активности сывороток представлены в таблице.

Было обнаружено, что адсорбция сывороток больных на стафилококковом реагенте с протеином А достоверно влияет на уровень их ферментативной активности. Данное влияние было разнонаправленным: наблюдалось как снижение, так и в некоторых случаях усиление исходной ферментативной активности.

В частности, в группе больных аутоиммунным тиреоидитом (24 больных) у 12 человек обнаруживалось уменьшение ДНКазной активности, у 1 пациента эта активность увеличилась в сравнении с исходной. Амидазная активность в этой группе снизилась у 5 человек, увеличилась у 3-х.

В группе больных СКВ ДНКазная активность снизилась у 6 из 9 человек, повышения же данного вида активности выявлено не было. В свою очередь, БАПНА-амидазная активность достоверно уменьшилась у всех больных этой группы.

Наконец в контрольной группе из 11 доноров снижение ДНКазной активности выявлено у 3 человек, амидазная активность достоверно снизилась у 2-х обследуемых. Снижение обоих видов ферментативной активности в сравнении с контрольной группой происходило чаще у больных СКВ ($p=0,09$ для ДНКазной активности и $p<0,001$ для БАПНА-амидазной).

Снижение ферментативной активности сывороток после адсорбции в некоторых случаях могло достигать 50% и даже более. Это было особенно характерно для БАПНА-амидазной активности при СКВ.

Таблица

ДНКазная и БАПНА-амидазная активность сывороток больных аутоиммунными заболеваниями

Группы	ДНКазная активность, ЕД/мл сыв-ки	Амидазная активность, ЕОП/мл сыв-ки
Больные СКВ (n=9)	14,66±1,95	1,31±0,23
Больные АИТ (n=24)	12,47±1,45	0,75±0,06*
Доноры (n=11)	13,81±2,25	0,99±0,1

Примечание: звездочкой помечено достоверное снижение амидазной активности больных АИТ в сравнении с группой больных СКВ и донорами. Другие различия между группами недостоверны.



Рис.1. Электрофорез препаратов иммуноглобулинов, выделенных от больных аутоиммунными заболеваниями, в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (окраска Кумасси R250).

С учетом выраженных изменений сывороточной ферментативной активности (особенно у больных СКВ), после адсорбции на аффинном сорбенте, нами была параллельно изучена абзимная активность препаратов IgG, выделенных из сыворотки больных данной группы.

Анализ полученных результатов показал, что взаимоотношения между сывороточной и абзимной активностью весьма переменны. Нами были обнаружены препараты IgG, обладающие высокой собственной ДНКазной активностью. При этом величина абзимной активности соответствовала той доле ДНКазной активности сыворотки, которая адсорбировалась на стафилококковом реагенте. Однако у большинства больных величины абзимной активности были существенно ниже соответствующей ферментативной активности сыворотки. Например, для БАПНА-амидазы величина абзимной активности выделенных препаратов IgG составила 10-30% от адсорбированной активности фермента.

Обнаруженные различия могут быть связаны со многими обстоятельствами. Необходимо учитывать, что вместе со свободными молекулами иммуноглобулинов аффинный сорбент способен связывать иммунные комплексы. Количество их увеличивается при аутоиммунных заболеваниях, и особенно значительно – при СКВ. Помимо других молекул, в состав таких комплексов входят и ферменты [15], которые могут удаляться с сорбентом при хроматографии. Кроме того, для многих видов энзимов характерно наличие высокоактивных сывороточных ингибиторов. Мощные ингибиторные системы описаны, например, для сывороточной ДНКазы [10]. В роли таких ингибиторов могут выступать и молекулы иммуноглобулинов, которые также удаляются при сорбции. Вышеуказанное явление может по крайней мере частично объяснить обнаруженные нами слу-

чай увеличения ферментативной активности сывороток у больных аутоиммунным тиреоидитом.

Наконец, отличия в ферментативной активности сывороток и антител связаны и с особенностями техники выделения препаратов иммуноглобулинов. Неоднократно подчеркивалось, что при использовании любого метода очистки АТ из сыворотки происходит неконтролируемое изменение (главным образом снижение) абзимной активности [1]. Это связано с обработкой получаемых АТ детергентами, пребыванием препарата абзима в диссоциирующих условиях, например в кислом буфере, использованием сильных анионообменников и т.д.

Тем не менее, несмотря на все вышеприведенные обстоятельства, наши эксперименты продемонстрировали, что при аутоиммунных заболеваниях значимую долю суммарной сывороточной ферментативной активности составляет активность каталитических антител. В этой связи закономерно возникает вопрос: является ли абзимная активность лишь иллюстрацией, признаком протекающих в организме процессов, или она имеет самостоятельное патогенетическое значение?

Доказать непосредственное участие абзимов в развертывании патологических процессов по-прежнему представляется весьма сложной экспериментальной задачей. Для этого необходимо проследить взаимодействие абзимов с природными субстратами *in vivo* на тканевом и клеточном уровне. Тем не менее, полученные нами результаты, а также данные других исследователей указывают, что при определенных условиях абзимная активность может иметь самостоятельное патогенетическое значение.

Наши данные по сопоставлению БАПНА-амидазной (протеолитической) активности ИГ с суммарной сывороточной протеолитической активностью в целом схожи с результатами,

полученными R. Kalaga с соавт. [11]. По их данным протеолитическая активность АТ может даже превышать 30% от общей активности сыворотки по отношению к конкретному белковому субстрату. Это весьма существенная величина, она может быть патогенетически значимой, учитывая индуцибельность появления, длительный период полураспада и возможность направленного транспорта («таргетирования») молекул IgG; реакции же протеолиза задействованы в развитии большинства патологических процессов.

Что касается ДНКазной активности, то в исследованиях [7] было продемонстрировано, что АТ и их фрагменты могут достигать ядра клетки. Связываясь с нуклеопротеинами, они существенно влияют на внутриклеточный метаболизм. В свою очередь, в работе [12] было указано, что нуклеазные абзимы могут прямо регулировать клеточное развитие, участвуя в процессах апоптоза. Впоследствии это положение получило доказательство: некоторые из белков Бенс-Джонса (легкие цепи ИГ) оказались способными проникать в ядро клеток и вызывать апоптоз (исследование Matsuura K. с соавт. [13]) Это значительно расширяет патогенетический потенциал нуклеазных абзимов.

Наличие аутоАТ к ДНК является показателем аутоиммунного процесса при СКВ. Недавно показано (Napirei M. с соавт., 2000 г. [14]), что основным патогенетическим процессом при волчанке является нарушение утилизации эндогенной ДНК с закономерной индукцией аутоАТ к нуклеопротеиду. Часть таких АТ проявляет абзимную активность. Не исключается, что на первых этапах они могут играть приспособительную роль, разрушая избыток нуклеиновых кислот. Кроме того, в работе [12] показано, что ДНКазные абзимы могут реагировать не только с нуклеиновой кислотой, но и связанным с ней белковым матриксом. Это создает условия для одновременной индукции абзимов с протеолитической активностью. Все вышеизложенное еще больше расширяет спектр патогенетического действия абзимных антител, возникающих при аутоиммунных заболеваниях.

Выводы

1. Аффинная адсорбция сывороток больных аутоиммунными заболеваниями на стафилококковом сорбенте с протеином А приводит

к достоверным изменениям их ДНКазной и БАПНА-амидазной активности. Снижение исходной ферментативной активности сывороток наблюдается достоверно чаще у больных СКВ.

2. Взаимоотношения между сывороточной и абзимной каталитической активностью являются вариабельными, зависят от вида аутоиммунной патологии и изучаемой абзимной активности. У части больных аутоиммунными болезнями величина энзимной активности, связанной с антителами, может составлять до 10% и более от соответствующей активности сыворотки, что подтверждает значимую роль каталитических АТ в патогенезе аутоиммунных заболеваний.

Исследование выполнено при поддержке Белорусского Республиканского Фонда фундаментальных исследований, грант БРФФИ №Б03-345.

Литература

1. Александрова Е.С. // Мол. биол. – 1996. – Т.30, вып.4. – С.921–927.
2. Андриевская О.А., Бунева В.Н., Забара В.Г. и др. // Мол. биол. – 1998. – Т.32, №5. – С.908–915.
3. Барановский А.Г., Матюшин В.Г., Власов А.В. и др. // Биохимия. – 1997. – Т.62. – №12. – С.1590–1599.
4. Власов А.В., Хельм М., Наумов В.А. и др. // Мол. биол. – 1999. – Т.33. – №5. – С.866–872.
5. Генералов И.И. Абзимная активность иммуноглобулинов. – Витебск, 2000. – 167 с.
6. Генералов И.И., Сидорская Е.В. // Иммунология. – 1998. – №3. – С.54–56.
7. Иммунологическая регуляция клеточных функций: Сб. науч. тр. / Ленингр. педиатр. мед. ин-т.: Ред. Зайчик А.Ш. – Л., 1988. – 134 с.
8. Каньшкова Т.Г., Семенов Д.В., Власов А.В. и др. // Мол. биол. – 1997. – Т.31, №6. – С.1082–1091.
9. Козырь А.В., Колесников А.В., Яхнина Е.И. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 1996. – №2. – С.204–206.
10. Dewez B., Lans M., Allaey V. et al // Eur. J.Clin.Chem. Clin. Biochem. – 1993. – Vol.31. – P.793–797.
11. Kalaga R., Li L., O'Dell J.R. et al // J.Immunol. – 1995. – Vol.155. – №5. – P.2695–2702.
12. Kozyr A.V., Kolesnikov A.V., Aleksandrova E.S. et al // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1998. – Vol.75. – №1. – P.45–61.
13. Matsuura K., Ikoma S., Watanabe M. et al // Immunology. – 1999. – Vol.98, N4. – P.584–589.
14. Napirei M., Karsunky H., Zevnik B. et al // Nature Genetics. – 2000. – Vol.25, N2. – P.177–181.
15. Wada T., Aoyagi T., Kojima F. et al. Dynamic relationship between hydrolytic enzymes and the immune system in rheumatic diseases. // J.Clin.Biochem.Nutr.–1987.–Vol.2, N 1.–P.71–81.

Поступила 28.02.2005 г.

Принята в печать 29.03.2005 г.